

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**КВАНТОВЫЕ ТОЧКИ CUINS₂, КАК ФОТОАКТИВНЫЕ АГЕНТЫ
ПРИ АНТИМИКРОБНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы
направления 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Тельновой Валерии Витальевны

Научный руководитель:

к. б. н., доцент



подпись, дата

Е. С. Тучина

Заведующий кафедрой:

д. б. н., профессор



подпись, дата

11.06.21

С. А. Коннова

Саратов 2021

ВВЕДЕНИЕ

Поиск новых антибактериальных агентов сейчас становится все более и более актуальным. Широкое применение антибиотиков ведет за собой распространение антибиотико-резистентных микроорганизмов, что усложняет клиническую практику лечения воспалений, вызванных бактериями [1-3]. Любое усовершенствование антибиотиков со временем приводит к бактериальной устойчивости. Требуется поиск альтернативных подходов, которые не будут вызывать резистентности. Применение фотодинамической терапии и использование наночастиц в качестве фотосенсибилизаторов может поменять соотношение сил в этой неравной битве [4].

В настоящее время большое количество исследований посвящается синтезу и выявлению свойств новых наночастиц, а также возможности их применения в качестве фотосенсибилизаторов и фотокатализаторов.

Целью работы являлась оценка эффективности использования нового вида наночастиц – квантовых точек CuInS_2 , как фотосенсибилизаторов для антимикробного фотодинамического воздействия.

Поставлены следующие задачи:

- 1) изучить темновую токсичность квантовых точек CuInS_2 по отношению к микроорганизмам *Staphylococcus aureus* 209 P;
- 2) выявить чувствительность *S. aureus* 209 P к действию светодиодного излучения (365 нм, 405 нм);
- 3) определить влияние светодиодного излучения (365 нм, 405 нм) в сочетании с квантовыми точками CuInS_2 на выживаемость клеток *S. aureus* 209 P;
- 4) оценить характер взаимодействия клеток *S. aureus* 209 P с квантовыми точками CuInS_2 с помощью метода конфокальной микроскопии.

В нашем исследовании наночастицы CuInS_2 впервые рассматриваются как объект применения для антимикробного фотодинамического воздействия. В

эксперименте проверялись антибактериальные свойства наночастиц CuInS_2 в оболочке ZnS с соотношением Cu/In равными 1/8 (CIS 1/8) и 1/20 (CIS 1/20).

В качестве бактериальной культуры использовали *S. aureus* 209 P, полученный из коллекции культур (ГИСК им. Л.А. Тарасевича, Москва, Россия). Культивирование бактерий осуществляли на универсальной плотной питательной среде (ГРМ-агар, Обнинск, Россия).

В качестве источника оптического излучения было выбрано два светодиода. Первый светодиод с максимальной длиной волны 405 нм, шириной полосы 20 нм и плотностью мощности 17 мВт/см². Второй светодиод с максимальной длиной волны 365 нм, шириной полосы 10 нм и плотностью мощности излучения 17 мВт/см². Экспозиция проводилась в течение 5, 10, 15 и 30 мин.

Квантовые точки CuInS_2 в оболочке ZnS были синтезированы и предоставлены нам сотрудниками кафедры оптики и биофотоники СГУ им. Н.Г. Чернышевского.

Частицы в объеме 5 мл смешивали с раствором 70% спирта в соотношении 1:1, оставляли на 24 часа до образования двухфазного раствора. По прошествии времени, верхнюю фазу снимали, нижнюю фазу подвергали центрифугированию (15 минут со скоростью 10 000 об/мин). Получившийся осадок растворяли в 1 мл физиологического раствора и подвергали повторному центрифугированию (15 минут со скоростью 10 000 об/мин). Образовавшийся осадок растворяли в 0,9 мл физиологического раствора, получая рабочую концентрацию (0,1 мг/мл). Растворы гомогенизировали с использованием лабораторного вортекса (Vortex MX-S, DLAB). Суспензию бактерий (10^4 мг/мл) в объеме 0,1 мл добавляли к 0,9 мл раствора частиц. Полученную смесь оставляли в темноте на 15 мин. Затем суспензию объемом 0,1 мл помещали в экспериментальную кювету для облучения светом (405 нм или 365 нм) в течение 5, 10, 15 и 30 минут. После окончания экспозиции культуру распределяли по чашкам Петри с плотной питательной средой.

Учет результатов осуществлялся путем подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) через 24 - 48 ч после инкубации при 37°C. В качестве контроля принимали значения колониеобразующей способности для бактерий, не подвергавшихся облучению светом и не обработанных наночастицами. Каждый эксперимент проводился с десятикратной частотой.

Статистическая обработка данных проводилась при помощи программы Microsoft Excel. Оценка достоверности результатов проводилась на основе вычисления U-критерия Манна-Уитни.

Выпускная квалификационная работа состоит из 3-х глав: обзор литературы, материалы и методы, результаты.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Актуальность использования ФДВ в антибактериальной терапии.

В 1940-е гг. введение пенициллина, открытого в 1926 г. Флемингом, начало эру антибиотиков. Это открытие признано одним из величайших достижений в терапевтической медицине [1]. Флеминг же и был первым, кто предупредил о потенциальной резистентности к пенициллину [2].

Хотя устойчивость к антибиотикам можно рассматривать как неизбежное следствие их применения, нерациональное использование таких препаратов является основным фактором, способствующим возникновению резистентности микроорганизмов во всем мире [3]. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) недавно признала множественную лекарственную устойчивость одной из важнейших проблем, стоящих перед здоровьем человека во всем мире [4-5].

Появление и распространение резистентных бактерий повлекло за собой разработку альтернативных методов борьбы, одними из которых является фотодинамическое воздействие (ФДВ).

Антибактериальное фотодинамическое воздействие было впервые применено в 1960 г. Макмиллан использовал толуидиновый синий в сочетании с излучением видимого спектра против бактерий, водорослей и дрожжей. В результате 99% бактерий были убиты в течение 30 минут облучения (газовый лазер, 632 нм, мощность 21-30 МВт, непрерывный режим) [6].

Механизм работы фотодинамической терапии. Метод фотодинамической терапии основан на световой активации фотосенсибилизаторов (ФС) лазерным излучением. Фотосенсибилизаторы представляют собой специфические вещества, характеризующиеся избирательной чувствительностью к определенным длинам волн оптического диапазона [7].

В результате возбужденная светом молекула фотосенсибилизатора либо непосредственно вступает в окислительно-восстановительные реакции с образованием промежуточных радикальных продуктов, которые затем взаимодействуют с кислородом (фотохимические реакции I типа), либо передает

избыток энергии молекуле кислорода, которая при этом переходит в возбужденное синглетное состояние (фотохимическая реакция II типа) [8].

Синглетный кислород в настоящее время считается основным цитотоксическим агентом, определяющим развитие фотодинамического эффекта. Против синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$) у бактерий нет специфической ферментативной системы защиты. Кроме того, очень маловероятно, что бактерии смогли бы развить такую систему, поскольку $^1\text{O}_2$ – это не радикал кислорода, а просто заряженный молекулярный кислород (+0,98 эВ) [9].

Предполагается, что антибактериальное фотодинамическое воздействие (АФДВ) может вызывать гибель микробов и повреждение клеток с помощью трех механизмов: а) повреждение клеточной мембраны (или вирусной оболочки); б) инактивация основных ферментов и белков; в) повреждение ДНК.

В последнее десятилетие ФДТ также была объединена с нанотехнологическими методами, поскольку фотохимическая эффективность может быть значительно повышена за счет использования наночастиц [10].

Применение фотокатализаторов в форме наночастиц позволяет устранить недостатки применения молекулярных растворов фотосенсибилизаторов, сохранив при этом все положительные возможности данного подхода [11].

Существует два различных способа комбинирования наночастиц и ФДВ для антимикробного применения: нековалентная инкапсуляция или включение ФС в наносистемы и ковалентное связывание ФС с поверхностью наночастиц [12]. Но наиболее интригующим является способность наночастиц самим выступать в роли фотосенсибилизаторов.

Понятие о квантовых точках. Квантовые точки – это очень маленькие полупроводниковые кристаллы размером до 20 нм, содержащие всего 10^2 - 10^3 атомов. В результате они ограничивают электроны или электронно-дырочные пары во всех трех измерениях [13]. Впервые они были открыты в 1980 году. Квантовые точки обладают уникальными электронными свойствами, промежуточными между свойствами объемных полупроводников и дискретных

молекул, которые объясняются большим отношением поверхности частиц к их объему. Наиболее ярким проявлением этого является флуоресценция.

Структурно квантовая точка состоит из металлической сердцевины и оболочки, которая выполняет защитную функцию, а также делает квантовую точку биодоступной и специфичной. Комбинация различных молекулярных оболочек с ядром квантовой точки подбирается для конкретных диагностических или терапевтических целей. Каждый отдельный вид квантовой точки обладает своими уникальными физико-химическими свойствами, что в свою очередь определяет его потенциальную токсичность или отсутствие таковой [141].

Помимо этого, квантовые точки обладают характеристиками, которые делают их потенциально хорошими фотосенсибилизаторами. Самое важное из этих свойств – способность служить донором энергии для классических фотосенсибилизаторов через флуоресцентный резонансный перенос энергии (ФРПЭ) и способность напрямую взаимодействовать с кислородом через механизмы передачи энергии.

Квантовые точки CuInS_2 и перспектива их использования в антибактериальной воздействии. В последнее время фотокатализаторы на основе сульфидов металлов приобретают популярность в исследованиях фотокатализа, благодаря большому коэффициенту поглощения в спектральном диапазоне, хорошим тепловым свойствам и стабильностью к фотокоррозии по сравнению с соответствующими соединений бинарных металлов.

CuInS_2 (CIS) – интересный сульфид, обладающий широким спектром потенциальных возможностей применения, включая фотокатализ. Его зона проводимости построена из 5s орбитали In, а его валентная зона состоит из 3p орбитали S. Свойства этой наноструктуры уже были изучены для использования в деградации органических загрязнителей и восстановлении нитрат-ионов [15]. Квантовые точки $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$, обладающие высоким квантовым выходом люминесценции и долговременной стабильностью, способны связываться с биологическими молекулами. Это прямой

полупроводник с запрещенной зоной в объеме 1,45 эВ, высоким коэффициентом экстинкции в видимом спектральном диапазоне ($k \geq 104 \text{ cm}^{-1}$) [16]. Спектры поглощения и люминесценции лежат в «окне прозрачности биоткани», имеет исключительную устойчивость к радиации и дефектам [17]. В работе Понса наночастицы $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ показывают различие в острой местной токсичности, начало воспаления происходит только при концентрации в 10 раз больше, чем для их Cd содержащих аналогов [18].

CuInS_2 имеют большой потенциал в антибактериальной фотодинамической терапии, однако на сегодняшний день отсутствуют какие-либо исследования на эту тему.

Результаты. По результатам оценки, действие светодиодного излучения длиной волны 365 нм подавляет рост бактерий штамма *S. aureus* 209 P в среднем на 68% ($p \leq 0,05$) при воздействии в течение 30 минут. Действие светодиодного излучения длиной волны 405 нм подавляет рост бактерий штамма *S. aureus* 209 P в среднем на 57% ($p \leq 0,05$) при воздействии в течение 30 минут.

Оценка действия наночастиц CuInS_2 с соотношением $\text{Cu/In}=1/20$ и $\text{Cu/In}=1/8$ на бактериальные клетки *S. aureus* 209 P проводилась без доступа света в течение 150 минут, с контрольными точками 0, 30, 60, 90, 120 и 150 минут. КОЕ считалось относительно контроля без воздействия частиц. Квантовые точки CIS 1/8 проявляют значительно большую токсичность по отношению к бактериальным клеткам *S. aureus* 209 P, чем квантовые точки CIS 1/20. В среднем их токсичность выше на 28,8% ($p \leq 0,05$).

Квантовые точки CIS 1/20 в сочетании с действием света длинной волны 405 нм в течение 5, 10, 15 минут показали снижение КОЕ на 72%, 80% и 86% ($p \leq 0,05$) относительно контроля, не подвергавшегося воздействию света и наночастиц, соответственно. 30 минутная экспозиция показала снижение КОЕ на 89% ($p \leq 0,05$).

Квантовые точки CIS 1/20 в сочетании с действием света длинной волны 405 нм в течение 5, 10, 15 минут показали снижение КОЕ на 26%, 36% и 38% относительно контрольных образцов, не подвергшихся воздействию света и

наночастиц, соответственно. 30 минутная экспозиция показала снижение КОЕ на 55%.

Квантовые точки CIS 1/8 в сочетании с действием света длиной волны 365 нм в течение 5, 10, 15 минут показали снижение КОЕ на 66%, 81% и 88% ($p \leq 0,05$) относительно контроля, не подвергавшегося воздействию света и наночастиц, соответственно. 30 минутная экспозиция показала снижение КОЕ на 92% ($p \leq 0,05$).

Квантовые точки CIS 1/8 в сочетании с действием света длиной волны 405 нм в течение 5, 10, 15 минут показали снижение КОЕ на 11%, 30% и 34% ($p \leq 0,05$) не подвергавшегося воздействию света и наночастиц, соответственно. 30 минутная экспозиция показала снижение КОЕ на 47% ($p \leq 0,05$).

Так как квантовые точки CuInS_2 обладают собственной флюорисценцией, а бактериальные клетки подвергаются различным методам окрашивания, для изучения механизма взаимодействия наночастиц с *S. aureus* 209 P нами был выбран метод конфокальной микроскопии (Leica SP8 LIGHTNING Confocal Microscope). Клетки бактерий были окрашены красителем Cell Tracker (Invitrogen, USA).

Результаты конфокальной микроскопии показывают, что квантовые точки окружают бактериальную клетку, и, вероятнее всего, вызывают повреждение мембраны, что коррелирует с литературными данными по механизму антибактериального действия наночастиц меди [19]. Повреждение мембраны обуславливает антибактериальный эффект проводимой ФДВ.

Лучшее подавление роста бактерий *S. aureus* 209 P при воздействии светом длиной волны 365 нм, относительно воздействия света с длиной волны 405 нм в сочетании с квантовыми точками CuInS_2 наблюдается из-за спектральных свойств наночастиц, а также меньшей стойкости микроорганизмов к данной длине волны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка новых методов антибактериальной терапии сегодня необходима. При этом новые методы должны соответствовать определенным требованиям: не вызывать резистентность, иметь широкий спектр действия, быть простым для использования в повседневной клинической практике. Методом, который бы соответствовал всем этим критериям, может стать фотодинамическая терапия, одним из главных преимуществ которой является огромная вариабельность. В ФДВ методе для достижения максимальных результатов терапии есть возможность регулировать длину волны, природу фотосенсибилизатора/фотокатализатора.

При этом все большую популярность приобретают фотосенсибилизаторы-наночастицы, имеющие целый ряд преимуществ в сравнении с классическими фотосенсибилизаторами. Особое внимание стоит уделить новому классу наночастиц – квантовым точкам.

В работе были рассмотрены вопросы применения метода ФДВ в комбинации с квантовыми точками CuInS_2 .

По нашим результатам, наночастицы CuInS_2 могут быть использованы в качестве фотосенсибилизатора для антибактериального фотодинамического воздействия. Они эффективно подавляют рост микроорганизмов без проявления токсичности и могут обеспечить уничтожение бактерий, без последующего возникновения резистентности – главной проблемы применяемых сегодня антибактериальных терапий.

Таким образом, квантовые точки CuInS_2 с соотношением $\text{Cu/In} = 1/20$ и $\text{Cu/In} = 1/8$ показали себя, как новый, перспективный фотосенсибилизатор для антибактериального фотодинамического воздействия.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Livermore, D. M. Antibiotic resistance in staphylococci / D. M. Livermore // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2000. – V. 16, N. 1. – P. 3-10.
- 2 Aminov, R. I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future / R. I. Aminov // Front. Microbiol. – 2010. – N. 1. – P. 134.
- 3 Antibiotic resistance: what, why, where, when and how? / N. Sabtu [et al.] // British Medical Bulletin. – 2015. – V. 116, N. 1. – P. 105-113.
- 4 Мамонова, И. А. Действие наночастиц меди на клинические штаммы *Staphylococcus epidermidis* / И. А. Мамонова // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. – № 1. – С. 27.
- 5 Antimicrobial resistance: global report on surveillance [Internet] / WHO. 2014. URL: <https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> [15.02.2021]
- 6 Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview / J. Ghorbani [et al.] // Laser Ther. – 2018. – V. 27, N. 4. – P. 293-302.
- 7 Изучение антимикробной фотодинамической активности водных растворов наночастиц металлов / В. Б. Байбурин [и др.] // Вестник Саратовского государственного технического университета. – 2014. – Т. 4, № 1. – С. 77.
- 8 Узденский, А. Б. Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии / А. Б. Узденский. – М.: Наука, 2010. - 328 с.
- 9 Antimicrobial photodynamic therapy – what we know and what we don't / F. Cieplik [et al.] // Critical Reviews in Microbiology. – 2018. – V. 44, N. 5. – P. 571-589.
- 10 Antimicrobial photodynamic inactivation in nanomedicine: small light strides against bad bugs / R. Yin [et al.] // Future medicine. – 2015. – V. 10, N. 15. – P. 2379-2404.
- 11 Макаров, В. И. Спектральные свойства кристаллических наночастиц фталоцианина алюминия при лазерном возбуждении: автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук / В. И. Макаров. - Москва, 2018. - 22 с.

- 12 Effective photoinactivation of Gram-positive and Gram-negative bacterial strains using an HIV-1 Tat peptide-porphyrin conjugate / L. Bourré [et al.] // *Photochem Photobiol Sci.* – 2010. – V. 9, N. 5. – P. 1613-1620.
- 13 Ashoori, R. C. Electrons in artificial atoms / R. C. Ashoori // *Nature.* – 1996. – V. 379, N. 6564. – P. 413-419.
- 14 Hardman, R. A Toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors / A. R. Hardman // *Environmental Health Perspectives* – 2006. – V. 114, N. 2. – P. 165-172.
- 15 Nearly monodisperse CuInS₂ hierarchical microarchitectures for photocatalytic H₂ evolution under visible light Inorg / L. Zheng [et al.] // *Inorg Chem.* – 2009. – V. 48, N. 9. – P. 4003-4009.
- 16 Мустафаева, С. Н. Диэлектрические свойства монокристалла CuInS₂ в переменных электрических полях радиочастотного диапазона / С. Н. Мустафаева, М. М. Асадов, Д. Т. Гусейнов, И. Касымоглу // *Физика и техника полупроводников.* – 2015. – Т. 57, № 6. – С. 1079-1083.
- 17 Kolny-Olesiak, J. Synthesis and application of colloidal CuInS₂ / J. Kolny-Olesiak, H. Weller // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2013. – V. 5. – P. 12221-12237.
- 18 Cadmium-free CuInS₂/ZnS quantum dots for sentinel lymph node imaging with reduced toxicity/ T. Pons [et al.] // *Molecules.* – 2010. – V. 4, N. 5. – P. 2531-2538.
- 19 Copper nanoparticles with high antimicrobial activity / U. Bogdanović [et al.] // *Materials Letters.* – 2014. – V. 128. – P.75-78.

